

第354回東北医学会例会

雑誌名	東北医学雑誌
巻	116
号	1
ページ	36-61
発行年	2004-06
URL	http://hdl.handle.net/10097/51326

平成 15 年度医学部学生奨学賞・医学部奨学賞 授与式並びに第 354 回東北医学会例会

日 時: 平成 16 年 1 月 23 日(金) 午後 1 時 30 分から

場 所: 東北大学医学部大会議室 (2 階)

- 1 開 会
- 2 挨拶
- 3 審査報告
- 4 医学部学生奨学賞授与
- 5 医学部奨学賞 (金賞・銀賞) 授与
- 6 祝 辞
- 7 受 賞 者

医学部学生奨学賞

A yeast two-hybrid assay provides a simple way to evaluate the vast majority of *hMLH1* germline mutations.

5 年 鈴木 秀 幸

DSCP1, a Novel TP53-Inducible Gene, Is Upregulated by Strong Genotoxic Stresses and Its Overexpression Inhibits Tumor Cell Growth *in vitro*.

5 年 畠 達 夫

生きがいと全死因死亡に関する前向きコホート研究

4 年 三 好 寛 明

ヒト乳癌組織における liver receptor homologue-1 (LRH-1) の発現

4 年 齊 藤 涼 子

医学部奨学賞 (金賞・銀賞)

(金賞)

有機アニオントランスポーター遺伝子群の発見とその臨床応用

— 新規遺伝子群の発見 —

腎・高血圧・内分泌科 講師 阿 部 高 明

— 新規遺伝子群の臨床応用 —

肝・胆・脾外科 講師 海 野 倫 明

新たな免疫分子 OX 40 リガンドによる免疫制御機構の解明

免疫学分野 助教授 石 井 直 人

神経系幹細胞の分化運命決定メカニズムの解析

器官構築学分野 講師 若 松 義 雄

(銀賞)

アレキシサイミアの脳内情動処理機構についての研究

人間行動学分野 助手 鹿 野 理 子

GJB2 遺伝子変異による難聴の病態解析

耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員 工 藤 貴

サイトカイン誘導新規チロシンリン酸化蛋白 (STA1, STAM2) の遺伝子欠損マウスを用いた機能解析

老年・呼吸器内科 医員 山 田 充 啓

- 8 受賞者講演 (金賞・銀賞)
- 9 閉 会

有機アニオントランスポーター遺伝子群の発見とその臨床応用

海 野 倫 明

東北大学大学院 外科病態学 消化器外科学分野

阿 部 高 明

東北大学大学院 病態制御学 分子血管病態学分野



阿部 高明



海野 倫明

抗癌剤の感受性に関与することを明らかにしたことにより、癌治療への臨床応用が期待されている。また、我々の LST-1, LST-2 の発見に端を発したかのように多くの有機アニオントランスポーターが、我々の研究室から、あるいは国内外の研究室で単離され、図 1 のように、現在では 25 個以上の遺伝子からなる巨大な遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなり、トランスポーター研究は大きな裾野を広げている。本稿では LST-1, LST-2 の 2 つのトランスポーターに焦点を絞り、単離の経緯とその臨床応用について概説する。

1. はじめに

細胞は脂質 2 重膜による細胞膜により外界と隔離されており、細胞は様々な物質を選択的に細胞内に取り込む、あるいは細胞外に排出する機能を有している。脂溶性に富んだ物質は脂質 2 重膜を介した拡散により細胞内外の輸送を行っているが、両親媒性の低分子化合物は細胞膜に存在するトランスポーターにより選択的に細胞内外に輸送されると考えられている。肝臓においては胆汁酸の血中からの吸収や胆汁中への分泌にこれらトランスポーターが関与しており、肝細胞の抱合・解毒や、胆汁酸の腸肝循環などの重要な機能を担っている。また肝臓以外では腎臓の尿細管での再吸収や分泌、脳-血液関門での選択的輸送など、多くの臓器でもトランスポーターは重要な生理機能を担っていると考えられる。また、薬剤などの外因性物質の取込みにも関与していることから、各種病態を考える上で欠くべからざる分子であると考えられている。

我々は、ヒト肝臓に発現している肝特異的有機アニオントランスポーター、Liver-Specific Organic Anion Transporter-1, LST-1 を単離することに成功し、さらにサブタイプである Liver-Specific Organic Anion Transporter-2, LST-2 を単離し、両者の発現や機能を検討した。LST-1 とは異なり LST-2 は種々の消化器癌で異所性に発現していること、MTX 等の

2. Liver-Specific Organic Anion Transporter-1 の発見

我々は 1998 年にラット oatp-2, ラット oatp-3 の単離に成功しこれを報告した¹⁾。ラット肝臓においては oatp-1, oatp-2, oatp-3 の 3 つのクローンが単離され²⁾、またそのヒトホモログと考えられる OATP 遺伝子も単離された³⁾。しかしながらその後の詳細な検討により、ラットとヒト間で胆汁酸や抱合型ステロイド輸送の薬理学的特性の違いやヒト OATP と実際の生体肝の薬物取り込みの特性に違いが認められ、ヒト肝臓における有機アニオンの広範な基質の輸送はヒト OATP を含めた oatp 遺伝子群とは異なるトランスポーター遺伝子がつかさざる可能性が示唆されていた。そこで我々はヒト有機アニオントランスポーターならびに広い意味での有機アニオントランスポーターのサブタイプであるプロスタグランジントランスポーターのアミノ酸配列を用いて EST データベースを検索し未知の 3 種類のクローンを同定した。これらをプローブとしてヒト肝臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところすべてにシグナルが一致し、完全長を持つクローンが単離された。単離された cDNA は 691 アミノ酸からなり、疎水性解析から 12 ヶ所の膜貫通領域を有していることが推定された。細胞外には

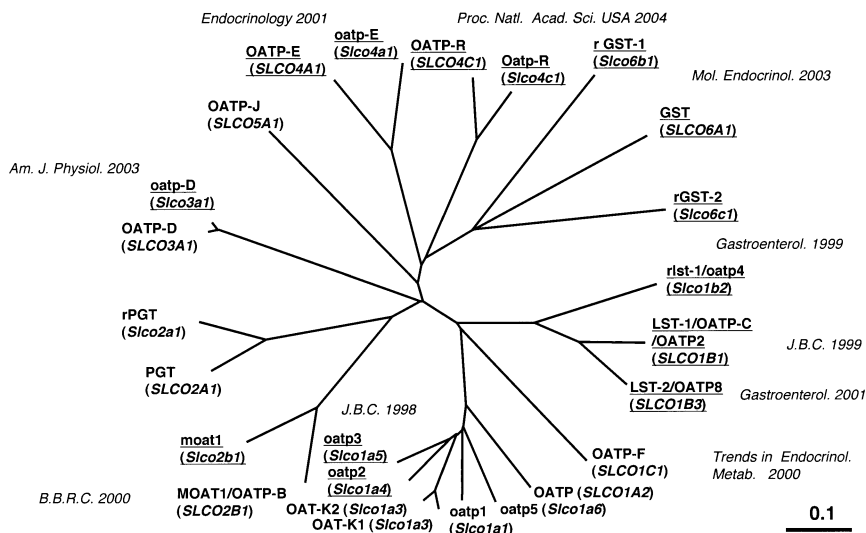


図 1. 有機アニオントランスポーター遺伝子群の樹型図
下線で示した遺伝子は我々の教室で単離したクローンである。

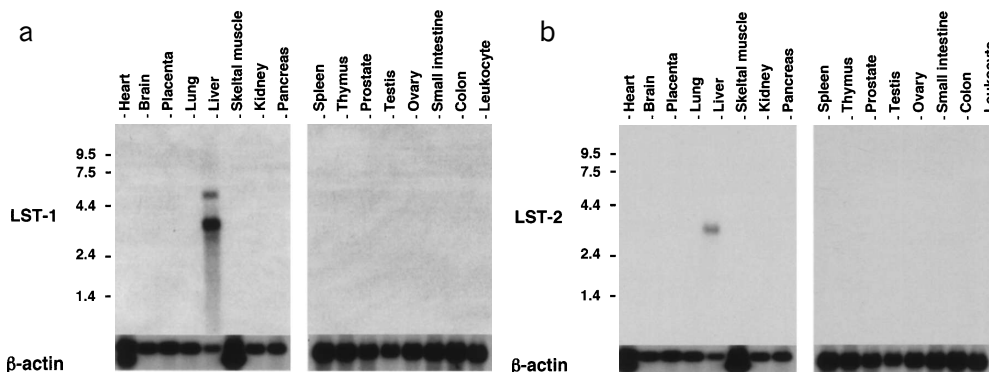


図 2. LST-1, LST-2 のノーザンブロット

糖鎖負荷部位が 7 ヲ所, 細胞内には A キナーゼのリン酸化部位が 1 ヲ所と C キナーゼのリン酸化部位が 1 ヲ所認められた。相同性解析からこのクローンは OATP 群とプロスタグランジントランスポーター (PGT) の両者と相同性を有していた。ノーザンブロット法によりこの cDNA の発現を検討すると, 図 2a のように, 肝臓でのみ発現が確認されたことより, Liver-Specific Organic Anion Transporter-1, LST-1 と命名し報告した³⁾。従来, ヒト肝臓では OATP が発現していると報告されていたが, 我々は LST-1 と OATP を完全に区別することが可能なプローブを用いて再度検討したところ, ヒト OATP は脳にのみ発現が認められ, 肝臓ではほとんど発現していないことが明らかとなっ

た³⁾。

次に LST-1 の薬理学的特性をアフリカツメガエル卵母細胞発現系により解析した³⁾。LST-1 cRNA を注入した卵母細胞はタウロコール酸を濃度依存的かつ飽和的に細胞内に取込み, その Km 値は 13.6 microM であった。この LST-1 による輸送は, 細胞外ナトリウムをコリンに置き換えても阻害されず, LST-1 はヒト肝臓においてタウロコール酸のナトリウム非依存性輸送を担っているものと考えられた。LST-1 は抱合型ステロイド (デヒドロエピアンドロステロン硫酸, エストラジオール 17β グルクロン酸, エストロン-3-硫酸) を極めて効率良く取り込むが, 非抱合型ステロイドであるアルドステロン, エストラジオール, テストステロ

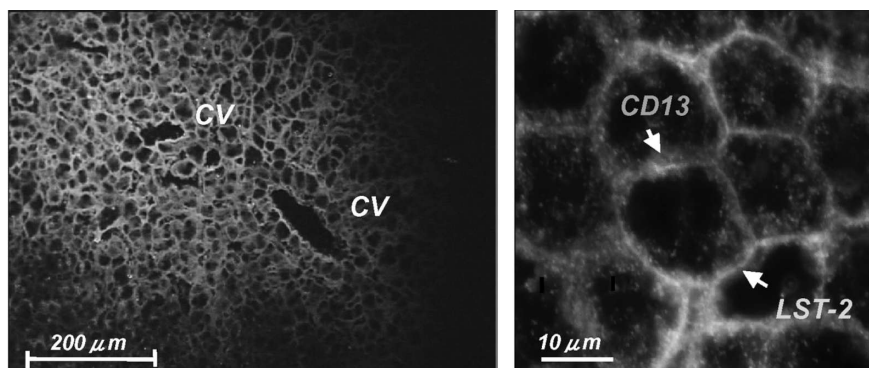


図 3. ヒト肝臓を用いた LST-2 の蛍光免疫染色
LST-2 は緑色，細胆管側細胞膜のマーカーである CD13 は赤色に染色される。
CV は中心静脈を示す。

ンなどは輸送されなかった。さらに LST-1 はプロスタグランジン E2, トロンボキサン B2, ロイコトリエン C4, ロイコトリエン E4 を輸送した。また LST-1 は甲状腺ホルモン (T3, T4) をも有意に輸送しその Km 値はそれぞれ 3.0 microM と 2.7 microM であった³⁾。

その後, LST-1 に関する追試が諸外国によってなされた。我々の報告の半年後に米国から同一のクローンがヒト OATP2 として命名されプラバスタチンを輸送することが報告された⁴⁾。またドイツからは LST-2 と同一のクローンがやはり OATP2 として報告され, 抱合型ビリルビンを輸送することが報告された⁵⁾。また金沢大学の辻らのグループも OATP-C として報告した⁶⁾。このように LST-1 は様々な名前が付けられており, 若干の混乱が生じているが, 現在このトランスポーター (LST-1/OATP2/OATP-C) は HUGO Gene Nomenclature Committee により Gene Symbol として SLC01B1 と命名されている。

3. LST-2 の発見とその発現様式

我々は LST-1 をプローブとしてヒト肝臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより LST-1 と相同性を有する新しいクローン, Liver-Specific Organic Anion Transporter-2, LST-2 を単離した⁷⁾。LST-2 は LST-1 とアミノ酸で 79.7% の相同性を有し, LST-1 や OATP などの他のナトリウム非依存性の有機アニオントランスポーターに共通する 12 回の膜貫通領域を有していた。LST-1 と LST-2 のそれぞれに特異的なプローブを用いたノーザンブロットにより, その発現が LST-1 と同様に肝臓のみに認められることより (図 2b) LST-2 と命名した。LST-2 の肝

臓での発現量はヒト肝臓 cDNA ライブラリーに含まれるクローンの数およびノザンブロットの結果から概算ではあるが数十分の一と推定された。次いで LST-1 と LST-2 の発現を区別して検討するために, LST-1 および LST-2 の C 末端のペプチドを抗原とする特異的抗体を作製し, ヒト肝臓の免疫染色を施行した。図 3 には LST-2 の蛍光免疫染色 (緑色) を示すが, LST-1, LST-2 とともに肝細胞膜が染色され, 細胆管側のマーカーである CD13 (赤色) とはシグナルが一致しないことから, LST-1 および LST-2 は肝細胞膜上に局在していることが明らかとなった。その染色パターンであるが, LST-1 は肝臓がほぼ均一に染色されるのに対し, LST-2 は中心静脈周囲の zone-3 と呼ばれる領域の肝細胞膜が強く染色された。その他, 正常組織では, 胃・小腸・大腸などの消化管や腎臓, 脳などは全く染色されないことから, ノーザンブロットの結果と同様に正常組織では肝臓にのみ特異的に発現していると考えられた。

一方, cDNA データベースサーチから LST-2 と同一の EST クローンが胃癌細胞株にて発現していることが判明したため, 種々の癌細胞株での発現を検討したところ, LST-2 は胃癌, 大腸癌, 膀胱癌, 胆道癌などの消化器癌で発現していることが明らかとなった。その一方で LST-1 の mRNA は唯一肝癌細胞株 (HT-17) で発現しているのみで, その他の消化器癌での発現は確認されなかった。LST-2 の基質特異性を解析したところ, LST-1 と同様にタウロコール酸や抱合型ステロイド, エイコサノイドを輸送することが明らかとなった。さらに有機アニオン系抗癌剤であるメトトレキセート (MTX) の取込みを検討すると, MTX も LST-1 および LST-2 の両者により濃度依存的かつ飽

和的に輸送されることが明らかとなった。

我々の LST-2 の報告とほぼ同時期に OATP8 と名付けられたクローンが単離され⁸⁾、これは LST-2 と同一のクローンであることが判明した。現在では Gene Symbol として SLCOB3 として分類されている。

4. 消化器癌の抗癌剤感受性と LST-2 の発現

以上のように、LST-2 が各種消化器癌由来培養細胞株で発現が認められたため、東北大学病院および関連施設で手術が施行された胃癌・大腸癌・膵癌・胆道癌・乳癌患者から得られた手術標本を用いて LST-2 の発現を検討した。LST-2 の特異的抗体にて免疫染色を施行したところ、胃癌 (図 4a)、膵癌 (図 4b) 大腸癌 (図 4c) のように癌細胞が染色されることが明らかになった。また同一症例のリンパ節転移巣も同様に染色される (図 4d) ことから、LST-2 の発現は癌細胞に特異的と考えられた。そこで、癌細胞の MTX 感受性と LST-2 発現との関連を明らかにするために、LST-1 または LST-2 遺伝子を組換えたアデノウイルスを作製し、LST-2 非発現細胞に導入し、MTX の感受性を検討した。LST-1 または LST-2 遺伝子組換えアデノウイルスベクターを用いて癌細胞に遺伝子導入し、各種濃度の MTX を添加し、細胞障害活性を MTT 法により検

討したところ、LST-1 または LST-2 遺伝子を導入した細胞株は、 β -Gal を導入したコントロール群に比較し、IC50 は約 1/3 から 1/10 の濃度へと変化した。すなわち LST-1 または LST-2 のトランスポーターを導入することにより、MTX の細胞内輸送が増加し低濃度で MTX による細胞障害活性が示された。さらに *in vivo* での効果を確認するため、癌細胞移植マウスを用いた治療モデルを作製し検討した。SCID マウスの背部皮下に 5.0×10^6 個の MDA-MB-231 細胞を移植し、1 週間後に LST-1、LST-2 組換えアデノウイルスを 2 日間腫瘍に局注し、さらにその後に MTX を腹腔内に 5 日間投与した。LST-1、LST-2 アデノウイルスを投与した群は、コントロール群である β -GAL アデノウイルス群と比較して有意に腫瘍の増殖が抑制され、トランスポーター遺伝子の導入により癌の抗癌剤感受性が変化することが明らかとなった (論文投稿中)。

さらに、実際の臨床現場において最もよく MTX が使用されている乳癌患者から得られた乳癌組織の LST-2 発現を検討したところ、102 例中 51 例 (50%) の患者に LST-2 の発現が確認された。LST-2 陽性乳癌と LST-2 陰性乳癌との間には腫瘍径、組織型、histological grade、ホルモン受容体などの因子では相関関係は認められなかったが、LST-2 陽性乳癌は LST-2 陰性乳癌と比較して有意に ($p < 0.0011$) 予後が良好

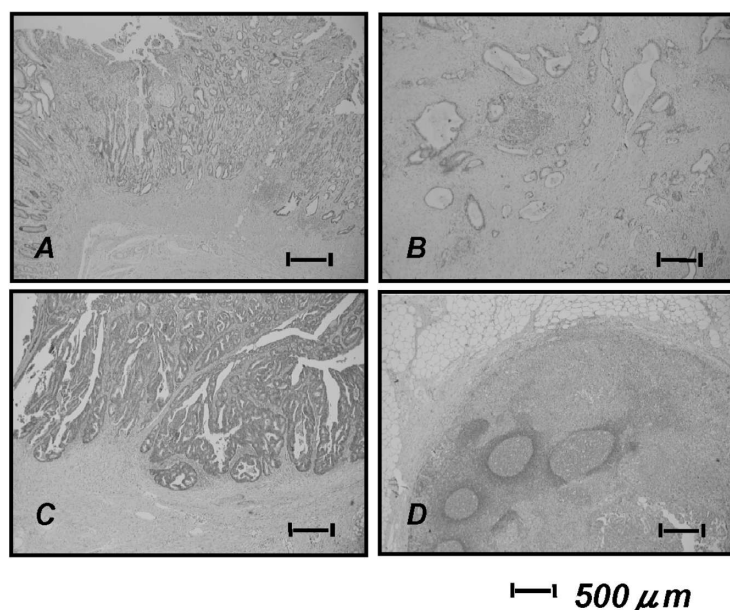


図 4. 癌組織における LST-2 の発現
A. ヒト胃癌標本, B. ヒト膵癌標本, C. ヒト大腸癌組織, D. リンパ節転移巣 (C と同一症例)
癌細胞が特異的に染色されている。

であった(論文投稿中)。この予後の相違は、MTX 投与群および MTX 非投与群の両者で観察され、MTX に対する感受性の相違のみでは説明がつかないことより、現在、LST-2 陽性乳癌の予後が良好であるメカニズムについて検討している。

5. 終わりに

以上、我々が単離した LST-1, LST-2 についてその発見の経緯と機能、および臨床応用に向けての歩みを概説した。今後はさらなるトランスポーターを単離し機能を解析し、生理機能や病態解明に役立てることが 1 つの目標である。それとともに癌などの病態時に発現していることを利用した分子標的治療や創薬への応用、抗癌剤感受性診断などの臨床に即した研究も今後引き続き進めていく所存である。

謝 辞

以上の研究に協力していただいた病態制御学・分子血管病態学分野(旧第 2 内科)および外科病態学・消化器外科学分野(旧第 1 外科)の多くの先生方に感謝するとともに、ご指導頂きました松野正紀教授、伊藤貞嘉教授に深謝いたします。

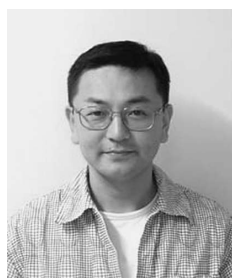
文 献

- 1) Abe, T., Kakyo, M., Sakagami, H. et al. (1998) Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22395-22401.
- 2) Kullak-Ublick, G.A., Hagenbuch, B., Stieger, B. et al. (1995) Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology*, **109**, 1274-1282.
- 3) Abe, T., Kakyo, M., Tokui, T. et al. (1999) Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17159-17163.
- 4) Hsiang, B., Zhu, Y., Wang, Z. et al. (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37161-37168.
- 5) König, J., Cui, Y., Nies, A.T. et al. (2000) A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, **278**, G156-164.
- 6) Tamai, I., Nezu, J., Uchino, H. et al. (2000) Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 251-260.
- 7) Abe, T., Unno, M., Onogawa, T. et al. (2001) LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*, **120**, 1689-1699.
- 8) König, J., Cui, Y., Nies, A.T. et al. (2000) Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J. Biol. Chem.*, **275**, 23161-23168.

新たな免疫分子 OX40 リガンドによる免疫制御機構の解明

石 井 直 人

東北大学大学院医学系研究科 生体防御学講座 免疫学分野



1. はじめに

抗原特異的T細胞の活性化にはT細胞受容体(TCR)を介した抗原刺激とともに、抗原提示細胞(APC)から供給される副刺激が不可欠である。副刺激なしで抗原刺激のみを受けたT細胞は、その抗原に対し不応答(anergy)となり生存できない。従ってAPC上に発現する副刺激分子の解析はT細胞の免疫応答を理解する上で極めて重要である。近年、生体内のAPCとして必須の働きを有する樹状細胞のin vitro 解析法が確立され、樹状細胞上の機能分子が注目されている。OX40 リガンド(OX40L)は成熟樹状細胞に発現し、活性化T細胞上のOX40 と結合することにより副刺激分子として機能する(図1)。最近、OX40/OX40L 系が多発性硬化症や関節リウマチなどの自己

免疫疾患、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患、あるいは移植片対宿主病(GVHD)や腫瘍内リンパ球浸潤、感染症など種々の病態に関与することが報告され、これら疾患におけるOX40/OX40L系の重要性が明らかになりつつある。本稿では、我々が樹立したOX40L遺伝子欠損(KO)マウスおよびトランスジェニック(Tg)マウスを用いて行った免疫反応解析結果を中心に、T細胞-APC相互作用に関与する分子として注目されるOX40/OX40L系の機能と、OX40シグナルを介した自己免疫疾患発症機序について概説する。

2. OX40-OX40L系の機能

TNFファミリー分子であるOX40Lは、HTLV-I p40taxによって発現誘導される分子として我々の研究室で遺伝子単離したgp34である¹⁾。OX40Lは無刺激では正常血液系細胞上にはほとんど発現がみられ

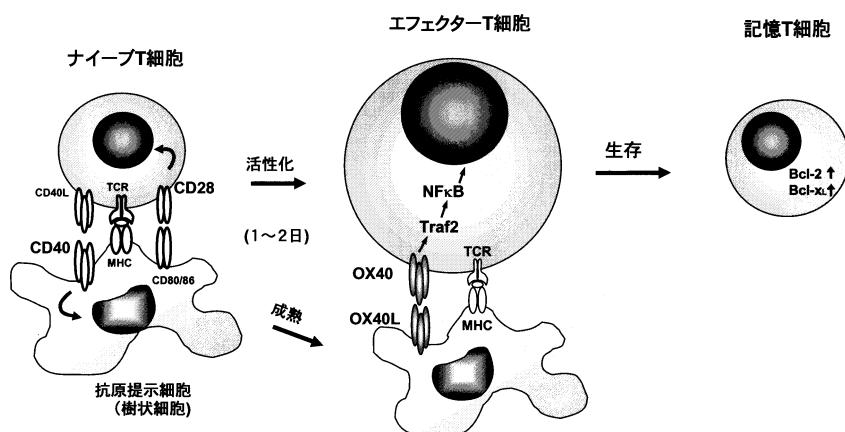


図1. ナイーブT細胞は抗原提示細胞により提示された抗原を認識すると同時に、CD28などの副刺激を受けることにより活性化。T細胞は副刺激を受けないと、抗原に対して不応答となる。活性化したT細胞は細胞表面にOX40分子を獲得し、一方、抗原提示細胞は成熟に伴いOX40Lを発現する。それらが結合することにより、T細胞内にOX40を介した細胞死抑制シグナルが伝達され、エフェクターT細胞の生存が促進される。大部分のエフェクターT細胞は役割を終えると細胞死を迎えるが、その中で生き残ったものが記憶T細胞となると考えられている。従って、OX40シグナルによるエフェクターT細胞生存促進は、記憶T細胞産生に重要な役割を果たす。

ず, in vitro で B 細胞や樹状細胞を CD40 刺激等で活性化すると, 刺激 48 時間後に高い発現が誘導される²⁾. 一方, その受容体である OX40 (CD134) は T 細胞を抗原刺激すると 48 時間後をピークに一過性に発現する³⁾. これらの事実から, OX40 と OX40L の結合は抗原提示における T 細胞-APC 相互作用において生じる可能性が示唆された. 我々は OX40L の生体機能を明らかにするために OX40L 遺伝子欠損マウスを作製した. その結果, 同マウスにおいて抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞活性化障害が観察された. さらに, その T 細胞活性化異常が OX40L 欠損による APC 機能障害が原因であることを見出した²⁾. その後の種々の研究により, OX40-OX40L 系が T 細胞-APC 相互作用に直接的に関与し, 特に CD4 陽性 T 細胞に対して副刺激を与え, CD4 陽性 T 細胞の抗原認識および記憶 T 細胞への分化に重要な役割を果たすことが明らかになった (図 1)^{4,5)}.

3. 疾患における OX40-OX40L 系の関与

OX40 は従来 T 細胞活性化マーカーと知られ, 種々の疾患でその発現が報告されている. 表 1 に示した通り, 慢性関節リウマチの関節腔内リンパ球, クローン病および潰瘍性大腸炎組織中の浸潤細胞, GVHD におけるエフェクター T 細胞, 多発性硬化症での脳内浸潤 T 細胞など, 炎症部位でのエフェクター T 細胞にその発現が見られる. 一方, OX40L については, クローン病および潰瘍性大腸炎組織中の血管内皮細胞, SLE の糸球体腎炎における糸球体の細胞, マウス実験的炎症性腸疾患における腸間膜リンパ節内樹状細胞, EAE の疾患発症後の小神経膠細胞などでの発現が報告されている. このように様々な疾患の炎症部位において OX40 および OX40L の発現が認められ, それら疾患の発症と OX40-OX40L 機能の関連性が示唆される⁴⁾. そこで我々は OX40L 欠損マウスおよび OX40L-Tg マウスを用いて, ヒト多発性硬化症モデルとして知られる実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 誘発を試みた. その結果, OX40L 欠損マウスでは発症が強く抑制さ

表 1. 各種疾患における OX40 および OX40L の発現

種	疾患	細胞		組織	文献
		OX40 の発現	OX40L の発現		
ヒト	間接リウマチ	CD4 陽性 T 細胞		関節腔液	12, 13
	GVHD	CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞		末梢血	12, 14
	成人 T 細胞白血病	白血病細胞		末梢血	15
	肺がん	CD4 陽性 T 細胞		原発腫瘍組織, 腫瘍浸潤リンパ節	16
	大腸がん	リンパ球		原発腫瘍組織, 腫瘍浸潤リンパ節	17
	増殖性ループス糸球体腎炎		血管内皮細胞	糸球体毛細血管壁	18
	クローン病	単核球		大腸固有層および粘膜下組織	19, 20
	潰瘍性大腸炎	単核球	血管内皮細胞	大腸固有層	19, 20
	セリアック病	CD4 陽性 T 細胞		大腸固有層	20
	多発性硬化症	T 細胞		血管周囲炎症組織	21
	多発筋炎	単核球		血管周囲炎症組織	22
Mouse	TNCB 誘発性大腸炎 (クローン病, 潰瘍性大腸炎モデル)	単核球		パイエル板, 大腸固有層	23
	OVA 誘発性気道過敏症 (喘息モデル)	CD4 陽性 T 細胞	CD44 陽性 T 細胞	気管支周囲, 気管支静脈周囲	24
	実験的自己免疫性脳脊髄炎 (多発性硬化症モデル)	CD4 陽性 T 細胞	小神経膠細胞, 血管内皮細胞	脊髄および脳組織	6, 25, 26
	T cell-transfer-induced colitis (クローン病モデル)		CD11c+ 陽性骨髄性樹状細胞	腸間膜リンパ節	27
	ウイルス性肺炎 (インフルエンザ)	CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞		気管支肺胞洗浄液, 縦隔リンパ節	28
	自己免疫性甲状腺炎 (橋本病モデル)		甲状腺内 B 細胞	甲状腺	29
	担癌モデル	CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞		原発腫瘍組織, 腫瘍浸潤リンパ節	30

れ、OX40L-Tg マウスでは重症化した⁶⁾。また、それらマウスを用いて接触性皮膚過敏症実験を行った。その結果、OX40L 欠損マウスでは皮膚腫張が抑制され、OX40L-Tg マウスでは皮膚腫張が強く促進された。この結果は皮膚樹状細胞であるランゲルハンス細胞機能異常によるものであることが明らかになった⁷⁾。以上の結果は、OX40-OX40L 系が T 細胞-APC 相互作用を介して自己免疫・アレルギー反応制御に直接的に関与していることを意味する。

4. OX40L-Tg マウスにおける自己免疫病発症

我々は T 細胞活性化における OX40 過剰刺激の生体における影響を明らかにするために OX40L-Tg マウスを作製した。前述の通り、T 細胞上の OX40 の発現は抗原刺激後一過性であるから、恒常的に OX40L を発現させ、APC 上の OX40L の発現量に関わらず T 細胞に OX40 刺激が過剰に加わることを想定した遺伝子改変マウスである。

作製した OX40L-Tg マウスを C57BL/6 と BALB/c に戻し交配を行った。その結果、C57BL/6 に戻し交配した OX40L-Tg マウスでは、高頻度で下痢症状と体重減少が観察された。次に、このマウスの組織病理学的解析を行った。肺においては肺泡中隔の肥厚と同部の単核球増加、気管支周囲、血管周囲のリンパ球浸潤が認められた。これらの所見は間質性肺炎の組織像に合致した。間質性肺炎は膠原病への合併など自己免疫病との関連が指摘されている疾患であるが、現在までその原因は不明である。間質性肺炎の自然発症モデルマウスは希少であり、また本マウスのような重篤なものは報告がない。一方、大腸においては、腸管粘膜の肥厚、陰窩膿瘍の形成、リンパ球浸潤がみられ、ヒト潰瘍性大腸炎様の組織像が観察された⁸⁾。炎症性腸疾患は免疫反応異常によって惹起される重篤な疾患であり、それが OX40 過剰刺激により活性化された T 細胞によって引き起こされたことは、その発症機序を考える上で興味深い。さらに、他の異常所見として、抗 ssDNA 抗体および抗 dsDNA 抗体の産生が観察され、自己免疫の病態が示唆された⁹⁾。

以上は全て C57BL/6 系統の OX40L-Tg マウスで得られた知見であり、BALB/c 系統の OX40L-Tg マウスでは全く異常病理所見を認めなかった。この事実は、OX40L-Tg マウスでみられた間質性肺炎と炎症性腸疾患が、OX40 過剰刺激による単なる非特異的組織炎症ではなく、何か特定の遺伝背景に関連した自己免疫機序で惹起された可能性を強く示唆する。疾患が自

然発症すること、疾患発症がヒト疾患と同様に特定の遺伝背景依存性であることから、OX40L-Tg マウスは極めて有用なヒト疾患モデル動物であると考えられる。

5. OX40L-Tg マウス由来 T 細胞移入による疾患の再現

前項で示した疾患の発症機序の詳細を明らかにするために細胞移入実験を試みた。仮に間質性肺炎や炎症性腸疾患発症が自己免疫機序であるとするならば、疾患発症 OX40L-Tg マウスの自己反応性免疫細胞を他のマウスに移入すれば、同様の疾患が再現できる可能性が高い。そこで、リンパ球欠損マウスである RAG2 欠損 (C57BL/6) マウスをレシピエントとして、C57BL/6 系統 OX40L-Tg マウスおよび同腹野生型マウスの T 細胞を移入し、OX40L-Tg マウスで観察された疾患が再現できるかどうかを検討した。その結果、OX40L-Tg マウス由来の CD4 陽性 T 細胞を移入した RAG2 欠損マウスは全例が下痢症状と顕著な体重減少を呈した。組織解析により OX40L-Tg マウスでみられたものと全く同一の間質性肺炎と炎症性腸疾患が再現された。細胞移入による疾患発症は、OX40 と OX40L の結合を阻害する抗 OX40L 抗体投与によって完全に抑制された。これらの結果より、疾患発症において CD4 陽性 T 細胞がエフェクター細胞であること、発症には OX40L-OX40 結合が必須であることが明らかになった⁹⁾。

6. 過剰 OX40 刺激による末梢 T 細胞免疫寛容の破綻

ヒト自己免疫疾患の多くは末梢での免疫寛容破綻が原因であると考えられている。間質性肺炎の多くは膠原病への合併が知られ、自己免疫機序の関与が指摘されている。また、潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患は、腸内細菌フローラに対する免疫寛容破綻が原因であるとの説が有力であり、これらの疾患発症と免疫寛容破綻は密接に関連している⁹⁾。しかしながら、生体内免疫寛容成立・維持の分子機構の詳細は明らかではない。

昨今、齧歯類の自己免疫抑制に関わる細胞として知られていた CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞 (Treg 細胞) が、ヒトの免疫寛容維持にも重要であることが指摘されたことから、Treg 細胞が新たな自己免疫抑制細胞として一躍脚光を浴びる存在となった⁹⁾。我々は最近、マウス Treg 細胞が恒常的に OX40 を発現す

ることを見いだした。そこで、OX40 シグナルが Treg 細胞機能（通常の T 細胞活性化を抑制する）に与える影響を明らかにするための実験を行い、以下の結果を得た。野生型マウス由来の APC 存在下において T 細胞の増殖反応を Treg 細胞は強く抑制した。ところが用いる APC を OX40L-Tg マウス由来にすると、Treg 細胞は全くその抑制効果が発揮できなかった。その抑制効果は、阻害性 OX40L 単クローン抗体添加により完全に回復した。以上より、in vitro OX40L 刺激が Treg 細胞機能を完全に破綻させることが明らかになった¹⁰⁾。この事実は OX40L-Tg マウスにおける免疫寛容破綻が Treg 細胞機能障害によるものである可能性を示唆する。さらに、CD25 陰性 CD4 陽性 T 細胞と Treg 細胞を RAG2 欠損（リンパ球欠損）マウスに移植し、生体内での Treg 細胞機能を検討した。RAG2 欠損マウスに CD25 陰性 CD4 陽性 T 細胞のみを移入するとクローン病様炎症性腸疾患を発症するが、Treg 細胞を共移入すると、Treg 細胞の免疫寛容維持機能により疾患発症が完全に抑制される¹¹⁾。ところが、OX40L-Tg/RAG2 欠損マウス内では Treg 細胞を共移入しても、全く腸疾患発症は抑制できないことが分かった。すなわち in vivo においても過剰な OX40-OX40L 結合により Treg 細胞機能が破綻した¹⁰⁾。以上の結果より、OX40 刺激による免疫寛容破綻のひとつの機序として、Treg 細胞依存性免疫寛容解除が関与していることが分かった。

7. おわりに

これまで、T 細胞副刺激分子遺伝子欠損マウスや、抗体などでそれらの機能を阻害することにより自己免疫発症が抑制されることから、それら分子がアレルギー・自己免疫発症に関与することは、以前から示唆されていた。しかしながら、T 細胞副刺激分子の過剰刺激により自己免疫疾患が誘発された例は OX40L-Tg マウスが初めてである。さらに、その発症がマウス系統依存点である点は、ヒト膠原病・炎症性腸疾患発症に特定の HLA や特定遺伝子の多型性が関与するという知見と良く合致している。その意味で同マウスは臓器特異的自己免疫発症の解析に有用なモデルマウスであると考えられる。さらに、疾患発症機序のひとつとして OX40 シグナルによる制御性 T 細胞 (Treg 細胞) 機能抑制を見いだした。今後、OX40 シグナルによる免疫寛容破綻機序の解析と、間質性肺炎、炎症性腸疾患発症における OX40 シグナル伝達機構の解明、さらには、これら疾患に対する OX40L をターゲットと

した治療法の開発を目指して、研究を続けていきたい。

謝辞：本稿を執筆するにあたり、共同研究者達に感謝すると共に、本研究の全てに多くの御助言と御指導を頂きました菅村和夫教授に深謝致します。

文 献

- 1) Miura, S., Ohtani, K., Numata, N. et al. (1991) Molecular cloning and characterization of a novel glycoprotein, gp34, that is specifically induced by the human T-cell leukemia virus type I transactivator p40tax. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1313-1325.
- 2) Murata, K., Ishii, N., Takano, H. et al. (2000) Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J. Exp. Med.*, **191**, 365-374.
- 3) Gramaglia, I., Weinberg, A.D., Lemon, M. et al. (1998) Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J. Immunol.*, **161**, 6510-6517.
- 4) Sugamura, K., Ishii, N. and Weinberg, A.D. Targeting the effector T cell costimulatory molecule OX40 for therapeutic disease intervention. *Nat. Rev. Immunol.*
- 5) Croft, M. (2003) Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 609-620.
- 6) Ndhlovu, L.C., Ishii, N., Murata, K. et al. (2001) Critical involvement of OX40 ligand signals in the T cell priming events during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, **167**, 2991-2999.
- 7) Sato, T., Ishii, N., Murata, K. et al. (2002) Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in langerhans cell function: enhanced contact hypersensitivity responses in OX40L-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, **32**, 3326-3335.
- 8) Murata, K., Nose, M., Ndhlovu, L.C. et al. (2002) Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *J. Immunol.*, **169**, 4628-4636.
- 9) Hori, S., Takahashi, T. and Sakaguchi, S. (2003) Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv. Immunol.*, **81**, 331-371.
- 10) Takeda, I., Ine, S., Killeen, N. et al. (2004) Distinct roles for the OX40-OX40L interaction in regulatory and non-regulatory T cells. *J. Immunol.*, **172**, 3580-3589.
- 11) Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S. et al.

- (1994) Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity*, **1**, 553-562.
- 12) Weinberg, A.D., Bourdette, D.N., Sullivan, T.J. et al. (1996) Selective depletion of myelin-reactive T cells with the anti-OX-40 antibody ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.*, **2**, 183-189.
 - 13) Giacomelli, R., Passacantando, A., Perricone, R. et al. (2001) T lymphocytes in the synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis display CD134-OX40 surface antigen. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **19**, 317-320.
 - 14) Kotani, A., Ishikawa, T., Matsumura, Y. et al. (2001) Correlation of peripheral blood OX40+ (CD134+) T cells with chronic graft-versus-host disease in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **98**, 3162-3164.
 - 15) Imura, A., Hori, T., Imada, K. et al. (1997) OX40 expressed on fresh leukemic cells from adult T-cell leukemia patients mediates cell adhesion to vascular endothelial cells: implication for the possible involvement of OX40 in leukemic cell infiltration. *Blood*, **89**, 2951-2958.
 - 16) Weinberg, A.D., Rivera, M.M., Prell, R. et al. (2000) Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J. Immunol.*, **164**, 2160-2169.
 - 17) Petty, J.K., He, K., Corless, C.L. et al. (2002) Survival in human colorectal cancer correlates with expression of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). *Am. J. Surg.*, **183**, 512-518.
 - 18) Aten, J., Roos, A., Claessen, N. et al. (2000) Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **11**, 1426-1438.
 - 19) Souza, H.S., Elia, C.C., Spencer, J. et al. (1999) Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, **45**, 856-863.
 - 20) Stuber, E., Buschenfeld, A., Luttges, J. et al. (2000) The expression of OX40 in immunologically mediated diseases of the gastrointestinal tract (celiac disease, Crohn's disease, ulcerative colitis). *Eur. J. Clin. Invest.*, **30**, 594-599.
 - 21) Carboni, S., Aboul-Enein, F., Waltzinger, C. et al. (2003) CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, **145**, 1-11.
 - 22) Tateyama, M., Fujihara, K., Ishii, N. et al. (2002) Expression of OX40 in muscles of polymyositis and granulomatous myopathy. *J. Neurol. Sci.*, **194**, 29-34.
 - 23) Higgins, L.M., McDonald, S.A., Whittle, N. et al. (1999) Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein. *J. Immunol.*, **162**, 486-493.
 - 24) Salek-Ardakani, S., Song, J., Halteman, B.S. et al. (2003) OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation. *J. Exp. Med.*, **198**, 315-324.
 - 25) Weinberg, A.D., Wegmann, K.W., Funatake, C. et al. (1999) Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.*, **162**, 1818-1826.
 - 26) Nohara, C., Akiba, H., Nakajima, A. et al. (2001) Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: a critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. *J. Immunol.*, **166**, 2108-2115.
 - 27) Malmstrom, V., Shipton, D., Singh, B. et al. (2001) CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J. Immunol.*, **166**, 6972-6981.
 - 28) Humphreys, I.R., Walzl, G., Edwards, L. et al. (2003) A critical role for OX40 in T cell-mediated immunopathology during lung viral infection. *J. Exp. Med.*, **198**, 1237-1242.
 - 29) Yu, S., Medling, B., Yagita, H. et al. (2001) Characteristics of inflammatory cells in spontaneous autoimmune thyroiditis of NOD.H-2h4 mice. *J. Autoimmun.*, **16**, 37-46.
 - 30) Gri, G., Gallo, E., Di Carlo, E. et al. (2003) OX40 ligand-transduced tumor cell vaccine synergizes with GM-CSF and requires CD40-Apc signaling to boost the host T cell antitumor response. *J. Immunol.*, **170**, 99-106.

神経系幹細胞の非対称分裂

若 松 義 雄

東北大学大学院医学系研究科 細胞生物学講座 器官構築学分野



まえがき

近年の一般社会における再生医学への期待の高まりについては、若干の恐怖心を覚える。確かに体の様々な組織に幹細胞が存在していることが示され、またいくつかの幹細胞が移植によって再生に参加できるという成果が報告される

におよんで、おそらく一般人の中には明日にでも体のあらゆるパーツが交換可能になるのでは、不老不死も夢はないのでは、と思っている人もけっこういるのではないだろうか。それを助長しているのは安易なテレビ報道にも問題があるのだろう。そういった状況であっても、我々研究者は基礎的なデータを積み上げ、得られた成果がほんとうに有効に利用されるように願い、努力しなければならない。多分化能を持っている細胞がいる、というのはよろしい。in vitro でいろんな細胞に分化できますよ、というのもけっこうなことだ。しかし、そこから望む種類の細胞を適切な数だけ増殖、分化させ、さらにそこから組織を再構築するのは、また別な次元の話である。

私の研究グループでは、神経堤細胞や神経上皮細胞と行った幹細胞を含んでいる神経系の細胞集団の分化制御について研究を行っているのだが、私が日々研究を行っていて実感するのは、幹細胞の増殖、分化について等の基本的な事柄について我々がいかに何も知らないか、ということである。

神経幹細胞のふるまい

脳を含む我々の中枢神経系は、外胚葉の一部が肥厚してできた神経板と呼ばれる組織から作られる。神経板は後に神経管というものをつくるが、これらの組織はいわゆる上皮組織であるので、それを構成する神経上皮細胞は基底膜側—脳室側（頂端側）という極性を持っており、この基底膜—脳室方向に長く伸びた形態をしている。そして、増殖している神経上皮細胞はその細胞体を細胞周期にあわせて上下動させている。これを interkinetic movement というのだが、なぜこのような動きをしているのか、誰も知らない。そして、細胞分裂は細胞体が脳室面までたどり着いた時に行われる。このような振舞いは、例えば胚の神経原基をスライス培養する等すれば、観察することができる。この神経上皮細胞の少なくとも一部が神経幹細胞だということになっているのだが、そもそも幹細胞というのは定義として、自己複製を行いながらより分化した細胞を生み出すということになっている。ところが、比較的最近になるまで、ちゃんとした観察はおこなわれていなかったのだ。

1995年に Chenn と McConnell は、フェレットの新生仔の脳皮質をスライス培養下で観察し、細胞分裂の向きと娘細胞のその後の振舞いに違いがあると報告した（図1）¹⁾。その結果では、細胞の分裂面が基底膜—脳室の軸にそっている場合には、2個の娘細胞の形態や振舞いに違いが見られず、どちらも神経上皮細胞のようにみえるので、これを対称分裂とした。一方、分裂面が基底膜—脳室の軸に直交するように分裂した場

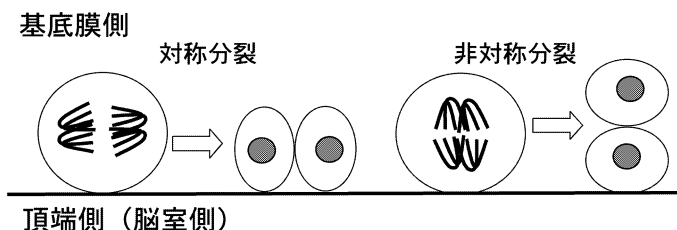


図1. フェレット脳で観察された神経上皮細胞の分裂方向

合、基底膜側の娘細胞はすみやかに脳室を離れて基底膜側にある神経細胞層に移動していくのに対し、脳室側の娘細胞はゆっくりと神経上皮細胞様の形態をとったことから、これを非対称分裂であると考えた。そして、ショウジョウバエの神経発生とのアナロジーから、非対称分裂に際して、なんらかの細胞運命決定因子が不等分配されている可能性が考えられた。

非対称分裂時の Numb タンパク質の不等分配

ショウジョウバエの神経系の発生時における非対称分裂において不等分配される因子として良く知られているタンパク質としては、Prospero と Numb が挙げられる。Prospero は転写制御因子をコードしているが、脊椎動物の相同な分子である Prox-1 が分裂時に不等分配されるという報告は無い。一方 Numb は神経系の細胞が分裂する時に非対称な細胞内局在を示し、不等分配される。筆者らは、ニワトリの神経上皮細胞が分裂する時に、Numb が基底膜側に局在することを見つけた²⁾。また、Numb が Notch 受容体の細胞内領域に直接結合し、Notch シグナル（ニューロン分化を抑制することがよく知られている）の活性化を阻害することもわかった²⁾。これらの観察は、ショウジョウバエのニューロブラストの非対称分裂と基本的に同じであった。これらの観察と上に述べたフェレットでの分裂方向の観察結果とを結び付けると、神経上皮細胞の分裂面が基底膜-脳室の軸に直交するようになった場合、基底膜側に局在した Numb が基底膜側の娘細胞に偏って分配され、Notch シグナルを抑制することでニューロン分化を促進すると予想された。

分裂方向と Numb の局在を一致させる

その後、Chenn と McConnell の報告に触発される形で、さまざまな脊椎動物の神経上皮細胞の分裂パターンと分化との関連が調べられた。その結果、Chenn と McConnell が非対称分裂ではないかと考えた、分裂

面が基底膜-脳室の軸に直交するようなタイプの細胞分裂はほとんど観察されず、一般的に分裂方向で神経分化を説明するのは難しいと考えられるようになった。

となると、我々の考えたモデルもリバイスしないといけない。この間我々は、Numb と結合して同様の細胞内局在を示す分子を見つけており、Numb が基底膜側に局在するためのアンカーとして働いていることがわかっていた。そこで、この分子（中間径フィラメントの構成タンパク質）にクラゲの蛍光タンパク質である GFP を融合させたものを神経上皮細胞に発現させ、その動態をニワトリ大脳のスライス培養で観察することを試みた。すると、分裂期中期の終わり頃まで（およそ 2 時間ある M 期のほとんどを占める）は基底膜側に局在しているが、最後の 10~15 分で側方に移動して、分裂面が基底膜-脳室の軸に平行なタイプの細胞分裂（すなわち、Chenn と McConnell が対称分裂ではないかと考えた分裂方向）でも不等分配されていることがわかった（図 2）。この観察結果は、少なくともニワトリでは細胞の分裂方向は重要でないことを示唆している。

上皮としての極性は重要なのか

上に述べたように、Numb は最初分裂期神経上皮細胞の基底膜側に局在している。つまり、後に側方に移動してしまうとはいえ、最初の Numb の局在は上皮細胞の本来持っている極性を指標にしていると想像させる。しかし、我々は同時に末梢神経系の発生も研究してきたが、神経堤由来の未分化神経節細胞でも Numb が不等分配されることがわかった³⁾。これが中枢神経系と同様に Notch シグナルを抑制し、Notch1 → Sox2 という流れでおきるニューロン分化の抑制を阻害すると考えられた^{3,4)}。神経堤細胞はもともと外胚葉上皮に起源するが、胚体内を移動し始める時にいわゆる上皮-間充組織転換ということがおきる。この過程は脱上皮化とも呼ばれることからわかるように、上皮細

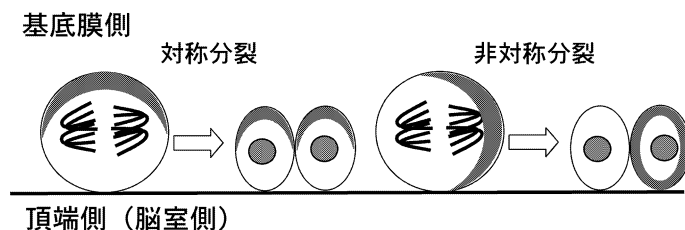


図 2. ニワトリ大脳の神経上皮細胞の分裂と Numb の分配

胞としての性質を失ってしまう。にも関わらず Numb の非対称な局在がみられるということは、別の制御メカニズムが存在していることを示している。しかし、その正体は今のところまったくわからない。

おわりに

現在筆者のグループでは Numb のアンカータンパク質の性質や、側方移動のメカニズム、ニューロン分化との関連について研究を進めているが、まだまだわからないことだらけという印象を持っている。我々の研究が幹細胞の応用利用になにか役に立つのかどうかはわからない。しかし、少なくとも、我々が幹細胞についてよく知らないことだけは、間違いない。

文 献

- 1) Chenn, A. and McConnell, S.K. (1995) Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell*, **82**, 631-641.
- 2) Wakamatsu, Y., Maynard, T.M., Jones, S.U. et al. (1999) NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron*, **23**, 71-81.
- 3) Wakamatsu, Y., Maynard, T.M. and Weston, J.A. (2000) Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development*, **127**, 2811-2821.
- 4) Wakamatsu, Y., Endo, Y., Osumi, N. et al. (2004) Multiple roles of Sox2, an HMG-box transcription factor in avian neural crest development. *Dev. Dyn.*, **229**, 74-86.

アレキシサイミアの脳内情動処理機構についての研究

鹿 野 理 子

東北大学大学院医学系研究科 人間行動学分野



アレキシサイミアは、a=欠如 lexis=言葉 thymos=情動というギリシャ語から形成された造語で¹⁾、直訳すれば感情を表す言葉を持たない人という意味である。その特徴は ① 感情を認識し、感情と情動喚起に伴う身体感覚を区別することの困難 ② 感情を表現することが乏しい、他者

の感情について語ることの困難 ③ 空想の乏しさに明らかな、限られた想像過程 ④ 刺激に規定された、外面性志向の認知様式、とされている。アレキシサイミアはもともと心身症に多い性格傾向といわれており、一般人口で 10% 前後であるのに対し、機能性消化器障害、身体表現性障害、パニック障害、摂食障害などの心身症疾患で 50% を越すアレキシサイミア傾向が報告されている。我々はこのようなアレキシサイミアと心身症の強い関連より、アレキシサイミアの情動処理過程を検討することが心身症形成のメカニズムを解く鍵となりうると考えた。

これまでも split brain や脳損傷患者の観察から、アレキシサイミアの脳機能変化が推測されており、左右大脳半球連絡障害説、右大脳半球機能変化説、辺縁系と大脳皮質間の連絡障害説、前帯状回の機能変化説などの仮説が提唱されてきた。しかしこれらの仮説は間接的に脳機能を計測する方法によってのみ検証されてきており、これまでに神経機能画像などの直接的方法で検証した報告はない。そこで本研究ではアレキシサイミア傾向者では顔表情の情動認知能力が低下しているという報告²⁻⁴⁾に着目して、顔表情を視覚刺激として提示したときのアレキシサイミア傾向者における局所脳血流量変化を PET (positron emission tomography) を用いて検討した。

募集に応募してきた 247 名の正常男子大学生の中からトロントアレキシサイミアスケール (TAS-20) を用いてアレキシサイミア傾向者 12 名と、対照群として非アレキシサイミア傾向者 12 名とを PET 被験者とし

て選別した。平均年齢はそれぞれ、 23.2 ± 2.4 歳、 23.1 ± 1.7 歳で、TAS-20 値それぞれ 70 点から 61 点、49 点から 31 点であった。TAS-20 はアレキシサイミア傾向を測定するための最も信頼性の高い自己報告式の質問紙であり、値が高値であるほどアレキシサイミア傾向が高いことを示す。被験者の眼前のモニター上に呈示された顔表情写真 (怒り、悲しみ、幸福、無表情) を見ているときの局所脳血流 (rCBF: regional cerebral blood flow) の変化を $H_2^{15}O$ -PET により計測した。PET 被験者は全員右利きであり、精神、神経学的既往をもたず、事前に実験の内容と趣旨について説明を受け、書面により実験参加に同意した。脳血流画像の統計学的解析には SPM99 (Statistical Parametric Mapping) を使用した。怒り、悲しみ、幸福、無表情のそれぞれの表情を見ているときのアレキシサイミア群と非アレキシサイミア群の rCBF をグループ間比較した。また各被験者の TAS-20 の値を共変数とし、各表情認知時の各個人の rCBF 変化と相関分析を行った。

怒り、悲しみ、幸福の表情を見ているとき、対照群に比較してアレキシサイミア群は右半球の大脳新皮質を中心とした領域において rCBF 反応の減弱を示し、左大脳新皮質を中心とした領域において rCBF 反応の増大を示した⁵⁾ (Fig. 1)。アレキシサイミアにおいて rCBF 反応が減弱していた部位は右上・下前頭葉 (Brodmann Area: BA10, 44)、眼窩皮質 (BA11)、右下頭頂葉 (BA39, 40)、右後頭葉 (BA19)、右小脳であった。アレキシサイミアで rCBF 反応が増大していた部位は左前頭葉上部 (BA10)、左頭頂葉下部 (BA40)、左後頭葉 (BA19) であった。このような右半球の幾つかの領域が対照群よりも反応減弱を示し、左半球の幾つかの領域が反応増大を示す傾向は無表情提示には認められなかった。TAS-20 の値を共変数とした相関解析においては、怒り、悲しみの表情を見ているとき右大脳新皮質を中心とした領域において rCBF と TAS-20 値との間に負の相関を認め、アレキシサイミア傾向が強いほど、右大脳新皮質における rCBF 反応の減弱を認めた。負の相関を認めた領域は右眼窩皮質

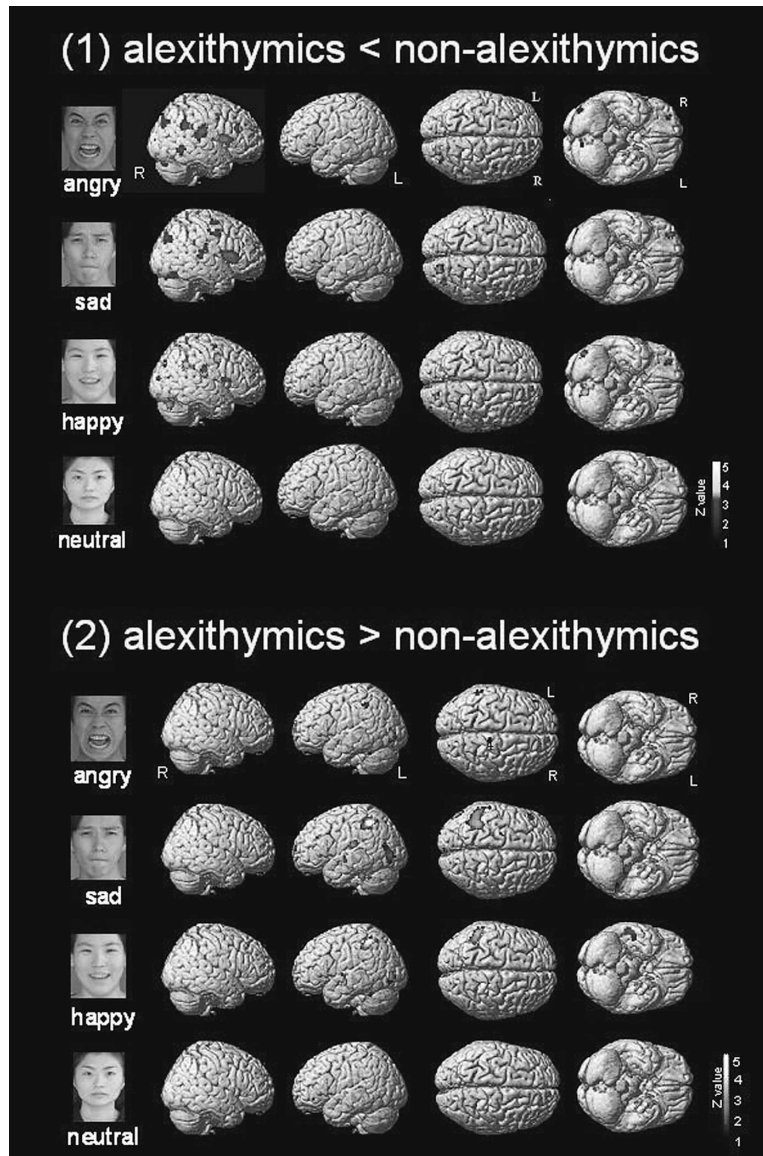


Fig. 1. 怒り, 悲しみ, 幸福の表情を見ているとき, 対照群に比較してアレキシサイミア群は右半球の大脳新皮質を中心とした領域において rCBF 反応の減弱を示し (上段), 左大脳新皮質を中心とした領域において rCBF 反応の増大を示した (下段)。

(BA11), 右下前頭葉(BA44), 右下頭頂葉(BA39, 40), 右後頭葉 (BA19) であった。幸福の表情をみているときには右眼窩皮質 (BA11) の脳血流とのみ負の相関を示した。無表情をみているときに TAS-20 値と負の相関をする rCBF 部位は認められなかった。一方, TAS-20 値と正の相関をする部位, アレキシサイミア傾向が高いほど rCBF 反応が増大する部位は認められなかった。また, 無表情をみているときに, 怒りの

表情を見ているときに活動する脳血流変化を比較するとアレキシサイミアでは右前帯状回 (BA24), 島皮質での血流減弱が認められた。

本研究より怒り, 悲しみ, 幸福の表情を見ているときアレキシサイミア群と対照群では異なる局所脳血流量を示すことが明らかになった。この結果はこれまで推測されてきたアレキシサイミアが対照とは異なる脳活動を示すという仮説を裏付け, アレキシサイミアの

神経生物学的要因として左右大脳半球のバランスの問題, 特に右大脳新皮質における反応性の減弱が存在することを示唆している。情動情報の処理は左大脳半球よりも右大脳半球で優位であるといわれており, 右半球の機能変化がアレキシサイミアの認知, 感情様式と関連する可能性がある。また本研究でアレキシサイミアと対照群の違いとして描出された領域のうち, 右下前頭葉, 右眼窩皮質, 右下頭頂葉などは情動表情認知に関連して活動する領域として報告されている。少なくともこれらの領域での表情にともなう情動情報の処理機構の変化がアレキシサイミアの背景に存在する可能性がある。これらの rCBF 反応の変化は限定された課題で認められたものであり, 本研究の結果のみからアレキシサイミアを説明する神経生物学的メカニズムを結論づけることはできない。しかしながら, アレキシサイミアの顔表情をみているときの局所脳血流量変化を本研究では明確に抽出しえた。感情処理や心身症の発症因子としての認知形式の研究における本研究の意義は大きいと思われる。

文 献

- 1) Sifneos, P.E. (1973) The prevalence of 'alexithymic' characteristic mechanisms in psychosomatic patients. *Psychother. Psychosom.*, **21**, 133-136.
- 2) Parker, J.D.A., Taylor, G.J. and Bagby, R.M. (1993) Alexithymia and the recognition of facial expressions of emotion. *Psychother. Psychosom.*, **59**, 197-202.
- 3) Mann, L.S., Wise, T.N., Trinidad, A. et al. (1994) Alexithymia, affect recognition, and the five-factor model of personality in normal subjects. *Psychol. Res.*, **74**, 563-567.
- 4) Lane, R., Sechrest, L., Reidel, R. et al. (1996) Impaired verbal and nonverbal emotion recognition in alexithymia. *Psychosom. Med.*, **58**, 203-210.
- 5) Kano, M., Fukudo, S., Yanai, K. et al. (2003) Specific brain processing of facial expressions in people with alexithymia: an $H_2^{15}O$ -PET study. *Brain*, **126**, 1474-1484.

GJB2 遺伝子変異による難聴の病態解析

工 藤 貴 之

東北大学病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科（現 いわき市立総合磐城共立病院 耳鼻咽喉科）

背 景



先天聾は 1,000 出生に 1 人の頻度で発生し、先天性の感覚器障害としては高頻度の疾患である。その半数は遺伝的な原因であると考えられている。これまでに、20 種類の非症候性遺伝性難聴の原因遺伝子が同定されている。その中で最も頻度の高い遺伝子変異

は *GJB2* 遺伝子変異である。

GJB2 (connexin26 遺伝子) 変異で先天聾を生じることが 1997 年に初めて報告され¹⁾、その後の解析で、欧米白人においては、遺伝性先天聾の半数以上が *GJB2* 変異によるものであることが分かった²⁾。また、変異の過半数は 35delG という一塩基欠失で、保因者頻度は 30~40 人に 1 人と高頻度である³⁾。マイクロサテライトマーカーを用いた解析の結果は、この 35delG 変異は複数の起源を持つ recurrent mutation である可能性を示唆した⁴⁾。

Connexin26 は、蝸牛外側壁線維細胞及びコルチ器支持細胞に発現しギャップジャンクションを形成し、神経細胞の興奮に用いられた K^+ イオンがリサイクルされる経路となっていると考えられている。この connexin26 の遺伝子変異により、ギャップジャンクションが障害され、内リンパへ K^+ イオンがリサイクルされなくなり神経細胞の活動が障害されることにより聴力障害が惹起されるものと考えられている。しかし、これを証明するためのノックアウトマウスは胎生致死で、蝸牛の病態は解析できなかった⁵⁾。剖検例 (1 例報告) ではコルチ器の変性を認めた⁶⁾。

目 的

Common disease である先天聾の原因遺伝子として重要な *GJB2* 遺伝子について、日本人において遺伝子解析を行い、遺伝子変異の欧米との相違、臨床像などについて検討する。また、ヒト患者の解析だけでは困

難な蝸牛の病態解析のため、*GJB2* 遺伝子変異マウスを作成する。ノックアウトマウスの作成は困難であることがすでに示されているので、優性的阻害効果 dominant negative effect を持つ遺伝子変異⁷⁾を導入したトランスジェニックマウスを作成する。さまざまな組織で発現が期待できる CAG プロモーターの下流にヒト変異 *GJB2* 遺伝子を結合したベクターを作成し、これをマウス受精卵に導入する。変異体を発現している個体は生存継代に不利であることが予想されるため、Cre 蛋白の存在下でのみ変異体が発現する Cre-loxP 系を用いる。遺伝子を off の状態で継代し、解析に必要な時に遺伝子を on にして発現を誘導し、症状のある個体を誕生させる。製作したマウスを電気生理学的、形態学的に解析することにより、connexin26 の内耳における機能を検討し、疾患の病態を解明することにした。

対象材料及び方法

I. 難聴者の遺伝子解析

1) 日本人難聴者の遺伝子解析

- ・両側高度 (90 dB 以上) 難聴者 39 人の白血球より DNA を採取し、直接シーケンス法で解析した。
- ・聴力正常者 203 人について、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法及び直接シーケンス法で保因者スクリーニングを行った。

2) タイ人難聴者の遺伝子解析

- ・タイ・バンコクの Sethsatian 聾学校に通学している小児難聴者及びその家族 12 家系 17 人について、直接シーケンス法で解析した。
- (遺伝子解析について、学内の倫理委員会の承認を得た。)

II. *GJB2* 遺伝子変異マウスの作成と解析

1) 遺伝子コンストラクトの作成

優性的阻害効果のある変異 R75W⁷⁾を有する connexin26 を CAG プロモーターで発現させ、内在性の connexin26 の機能を阻害させる。

- ・変異を発現した個体は生存に不利であることが予想されるので、Cre recombinase 存在下で変異体発現が

誘導される Cre-loxP 系を採用した。

2) 受精卵への遺伝子導入生後 6 週の C57BL/6 雌から採取した受精卵に遺伝子を注入し、偽妊娠状態の C57BL/6 に移植した。

トランスジェニックマウスの検定マウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、PCR 法にて目的の遺伝子が導入されている個体を選別した。その結果、変異 *GJB2* 遺伝子が導入されたマウス 11 系統が誕生した。

変異遺伝子発現マウスの作成変異遺伝子が導入された個体と、Cre 遺伝子をもつ C57BL/6 を交配し、変異遺伝子と Cre 遺伝子両方を持つマウスを作成した。それぞれの遺伝子の有無を PCR 法で同定した。変異個体について、生後 2 週と 7 週において聴力評価と形態学的解析を行った。

結 果

I. 難聴者の遺伝子解析

1) 日本人難聴者の遺伝子解析

先天性難聴者 39 人中 5 人に *GJB2* 変異を認めた。10 アリル中 7 アリルが、これまで欧米人では報告されていなかった 235delC という新しい変異だった (表 1)。聴力正常者 203 人中 2 人が 235delC 変異の保因者だった。

2) タイ人難聴者の遺伝子解析

12 家系 17 人中 3 家系 4 人が遺伝子変異を有していた。このうち 3 アリルが日本人に高頻度に見られる

235delC 変異だった (表 2)。

II. *GJB2* 遺伝子変異マウスの解析

2 系統 (9-10, 10-1) で変異遺伝子が発現した個体が誕生した。聴性脳幹反応 (ABR) を測定した結果、2 系統とも約 100 dB の高度難聴を示し (図 1)、ヒト患者の臨床像 (先天性の高度難聴) とよく一致していた。それぞれの時期における内耳について形態学的解析を行った結果、生後 2 週においてすでにコルチ器の形成障害を認め、更に生後 7 週においてはコルチ器の著明な細胞数減少を認めた (図 2)。その一方で、らせん靱帯には明らかな変化を認めなかった。内リンパ電位を測定した結果、内リンパ電位は正常範囲内だった。

考 察

日本人小児難聴者において、3 つの新しい *GJB2* 遺伝子変異を同定した。2 つはフレームシフト変異：235delC 変異と 176-191del(16) 変異、1 つはナンセンス変異：Y136X 変異だった。いずれの変異も connexin26 蛋白の合成が途中で中断するような変異で、connexin26 の機能が高度に障害されるものと思われた。これら 3 種類の変異の内、235delC 変異が最も高頻度の変異だった (変異アリル 10 のうち 7)。しかしながら、欧米人種の common mutation である 35delG 変異は今回日本人では難聴者にも健聴者にも見られなかった。235delC 変異がアジア人に特徴的なものかどうか

表 1. *GJB2* 遺伝子変異が同定された日本人難聴者

患者	性別	家族歴	遺伝子変異	
			アリル 1	アリル 2
1	男性	妹 1 人	235delC	235delC
2	女性	なし	235delC	235delC
3	女性	兄弟 2 人	235delC	235delC
4	女性	なし	235delC	176-191del(16)
5	男性	兄弟 4 人	176-191del(16)	Y136X

表 2. *GJB2* 遺伝子変異が同定されたタイ人難聴者

患者	性別	家族歴	遺伝子変異	
			アリル 1	アリル 2
1	男性	姉	235delC	235delC
2	女性	兄弟 2 人	235delC	W24X
3-1	女性	妹	M34L	変異同定されず
3-2	女性	姉	M34L	変異同定されず

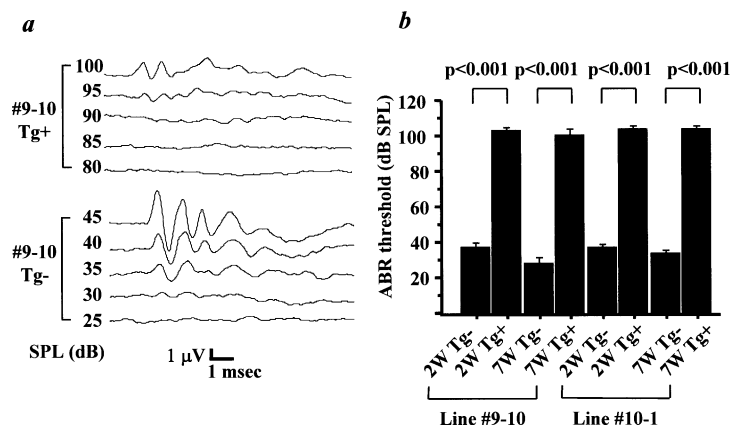


図1. 変異アリル非発現マウス (Tg-) と変異アリル発現マウス (Tg+) の ABR. a. 非発現マウス (#9-10Tg-) では 30 dB まで I 波-V 波が同定できるが, 変異発現マウス (#9-10Tg+) では 100 dB と 95 dB でのみ波形が見られ, それより低い音圧では波形が見られない. b. 生後 2 週と 7 週における #9-10 系統と #10-1 系統の平均聴力閾値. バー: それぞれのグループの標準偏差. トランスジェニックマウスでは, いずれの系統でも生後 2 週ですでに著明な閾値上昇が見られる. 生後 2 週の #9-10Tg+ マウス ($n=3$), 生後 2 週の #10-1Tg+ マウス ($n=6$), 生後 7 週の #9-10 Tg+ マウス ($n=8$), 生後 7 週の #10-1 Tg+ マウス ($n=4$) それぞれの聴力閾値は, 103.3 ± 2.9 , 103.3 ± 2.6 , 100 ± 3.8 , 103 ± 2.7 dB SPL だった. 一方生後 2 週の #9-10Tg- マウス ($n=5$), 生後 2 週の #10-1Tg- マウス ($n=3$), 生後 7 週の #9-10 Tg- マウス ($n=8$), 生後 7 週の #10-1 Tg- マウス ($n=5$) それぞれの聴力閾値は, 37 ± 2.7 , 36.7 ± 2.9 , 27.2 ± 4.4 , 33.8 ± 2.5 dB SPL だった.

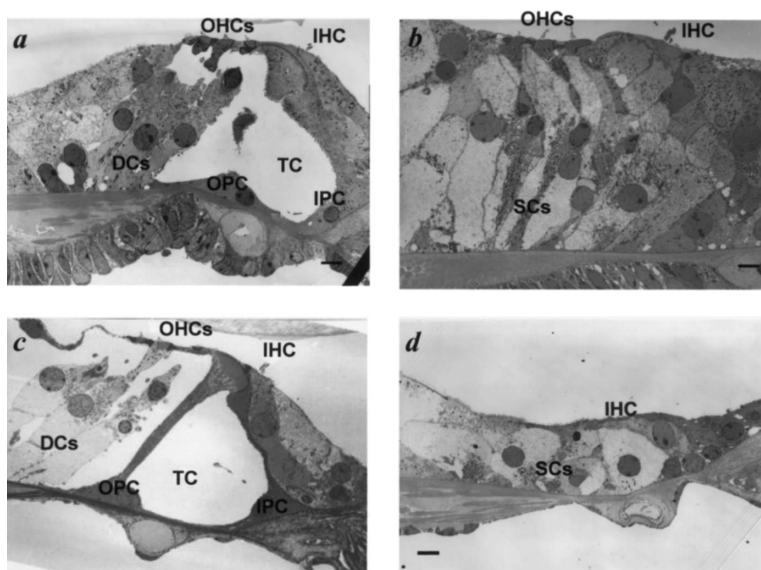


図2. 生後 2 週 (a, b) と生後 7 週 (c, d) の正常マウス (a, c) とトランスジェニックマウス (b, d) のコルチ器電子顕微鏡写真. OHCs: 外有毛細胞 (outer hair cells), IHC: 内有毛細胞 (inner hair cell), DCs: Deiter 細胞, TC: コルチトンネル (tunnel of Corti), SCs: 支持細胞 (supporting cells), OPC: outer pillar cell, IPC: inner pillar cell. 生後 2 週のトランスジェニックマウスでは (b) コルチトンネルが形成されず, 細胞の配列に乱れが生じている. 生後 7 週のトランスジェニックマウスでは, 外有毛細胞の消失と, 支持細胞の減少や変性が見られる.

検証するため、アジア人であるタイ人の先天聾者について *GJB2* 遺伝子変異解析を行った。その結果、タイ人でも日本人の高頻度変異の 235delC 変異が同定された。タイ人においても、欧米人種の common mutation である 35delG 変異は見られなかった。この知見は、35delG 変異が変異好発部位に発生する recurrent mutation であろうという仮説に対して否定的である。

以上、*GJB2* 遺伝子変異がアジア人においても先天性難聴の原因遺伝子になっていること、アジア人に特有の 235delC 変異が存在し *GJB2* 遺伝子の種類には人種毎に特徴があるということを示した。

次に、*GJB2* 遺伝子変異のモデルマウスを作成することに成功した。*GJB2* 遺伝子変異のマウスは、これまでの報告では胎生致死であり、成獣での解析は本研究が最初である。ABR を施行したところ、変異マウスはヒト同様の高度難聴であることが判り、connexin26 分子が聴覚の形成において重要であることを改めて示した。組織学的解析の結果、蝸牛の障害部位はコルチ器有毛細胞及び支持細胞で、特に外有毛細胞の変性消失と柱細胞の変性によるコルチトンネルの消失が特徴的だった。コルチ器が完成し聴覚が発生する 2 週齢の組織ですでにコルチ器の変性が認められ、ヒトでの臨床像（先天性難聴）とよく一致していた。蝸牛外側壁のラセン靱帯線維細胞や血管条には、電顕レベルでも変化は見られなかった。蝸牛内リンパ電位 (EP) を測定した結果、平均値 87.7 mV（正常値：80-100 mV）であった。connexin26 変異マウスにおいて内リンパ電位の低下がないことが示された。

Connexin26 は蝸牛外側壁およびコルチ器支持細胞のギャップジャンクションシステムにおいて K^+ イオンの輸送を行っており、*GJB2* 遺伝子変異により K^+ イオンリサイクルが障害されることが難聴発生の機序であると、これまで考えられてきた。また、上記二種類のギャップジャンクションシステムの内、特に蝸牛外側壁のギャップジャンクションが蝸牛内の高 K^+ イオン濃度の維持（内リンパ電位の形成）に重要であると考えられてきた。ヒト剖検例は一例だけ報告されており、コルチ器の変性が著明であるという所見だったが、死後変化による二次的なものなのではないかと思われていた。しかし、モデルマウスのコルチ器の変性所見は剖検例の所見とよく一致していた。一方、蝸牛

外側壁のギャップジャンクションシステムは、形態学的に異常を認めず、内リンパ電位が正常であることを反映していると推察される。今回の解析結果は、connexin26 の主な機能部位は蝸牛外側壁の connective cell gap junction system よりむしろコルチ器支持細胞のいわゆる epithelial cell gap junction system であり、遺伝子変異による難聴発生の機序は、内リンパ電位形成障害よりもコルチ器周辺の局所イオン環境の調節障害が主な病態であることを示唆した。

文 献

- 1) Kelsell, D.P., Dunlop, J.P., Stevens, H.P. et al. (1997) Connexin 26 mutations in hereditary nonsyndromic sensorineural deafness. *Nature*, **387**, 80-83.
- 2) Estivill, X., Fortuna, P., Surrey, S. et al. (1998) Connexin 26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet*, **351**, 394-398.
- 3) Zelante, L., Gasparini, P., Estivill, X. et al. (1998) Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1605-1609.
- 4) Morell, R.J., Kim, H.J., Hood, L.J. et al. (1998) Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *New Engl. J. Med.*, **339**, 1500-1505.
- 5) Gabriel, H.-D., Jung, D., Butzler, C. et al. (1998) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J. Cell Biol.*, **140**, 1453-1461.
- 6) Jun, A.I., MuGuirt, W.T., Hinojosa, R. et al. (2000) Temporal bone histopathology in connexin 26-related hearing loss. *Laryngoscope*, **110**, 269-275.
- 7) Richard, G., White, T.W., Smith, L.E. et al. (1998) Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmo-plantar keratoderma. *Hum. Genet.*, **103**(4), 393-399.

サイトカイン誘導新規チロシンリン酸化蛋白 (STAM1, STAM2) の 遺伝子欠損マウスを用いた機能解析

山 田 充 啓

東北大学病院 老年・呼吸器内科



1. はじめに

サイトカイン共通受容体 γ 鎖は T 細胞を始めとする種々のリンパ球の発生、分化に必須なシグナル伝達に関わり、X連鎖重症複合免疫不全症の原因遺伝子であることがすでに知られている。 γ 鎖下流のシグナル伝達機構を解析

するために、サイトカイン刺激でチロシンリン酸化される分子の同定が試みられ、その結果、東北大学医学部免疫学教室の竹下によって分子量 70 kDa の新規蛋白分子を STAM1 が同定された^{1,2)}。さらに STAM1 相同分子として 67 kDa の蛋白分子 STAM2 も同定された³⁾。

STAM ファミリー分子 (図 1) は IL-2, GM-CSF 等のサイトカインや EGF, PDGF といった増殖因子、さらに T 細胞抗原受容体刺激においてもチロシンリン酸化を受けることが確認されている¹⁻³⁾。

サイトカインや増殖因子シグナルに関わることが示唆された、新規チロシンリン酸化蛋白 STAMs の生体内での機能を解析すべく、遺伝子欠損マウスを作製した。

1. STAM1 欠損マウス

まず、定法に従い、STAM1 欠損マウスの作製を行った⁴⁾。STAM1 欠損マウスはメンデル測に従い正常に出生するが、6 週齢あたりから死亡するマウスが現れ、

6ヶ月以内に全例死亡した。さらに、STAM1 ホモ欠損マウスにおいて姿勢反射の異常を認め神経学的異常が示唆された。STAM1 は各種サイトカイン刺激によるリン酸化蛋白であるが、STAM1 ホモ欠損マウスにおいて血球系の異常は認められず、さらに、サイトカイン、T 細胞抗原受容体刺激に対する、T 細胞の増殖反応も正常だった。全身の組織病理学的解析において、STAM1 欠損マウスではリンパ組織も含め異常は認めなかった。しかし、唯一、STAM1 欠損マウスの海馬において明らかな異常を認めた。3 週齢のマウスの海馬では明らかな異常を認めないが、7 週齢のマウスにおいて CA3 領域の錐体細胞が明らかに減少しているのが認められた (図 2)。さらに、錐体細胞が欠落した CA3 領域において神経膠の増生を認め、その程度は 4 週齢に比し 7 週齢のマウスでより明らかになっていた。以上の結果から STAM1 は神経細胞特に海馬の CA3 錐体細胞において重要な役割を担っていることが示唆された。

2. STAM1 & STAM2 ダブル欠損マウス

In Vitro の解析結果から STAM1 と STAM2 が相補的に機能している可能性が示唆されていた。そこで、STAM2 欠損マウス及び STAM1, 2 のダブルノックアウトマウスを作製、解析した。STAM2 欠損マウスは正常に発生し、血球系、神経系を含め明らかな異常は認めなかった。

ダブルノックアウトマウスは、胎生 11.5 日までに全例死亡した。ダブルノックアウトマウスは腹側形態形成の異常を認め (図 3)、このことから STAM はマウ

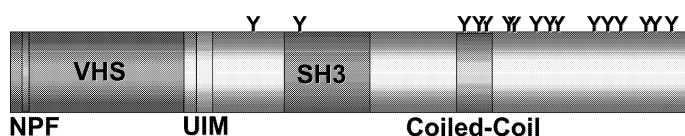
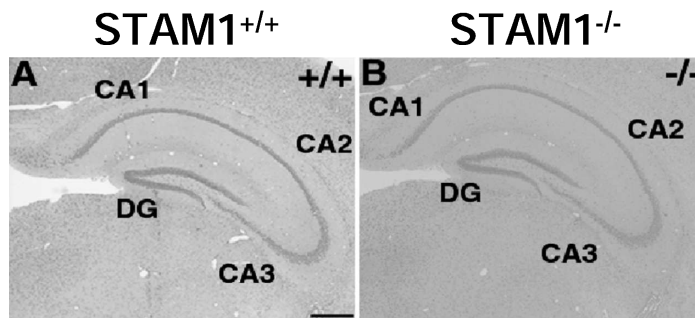


図 1. STAMs の基本構造

3 week



7 week

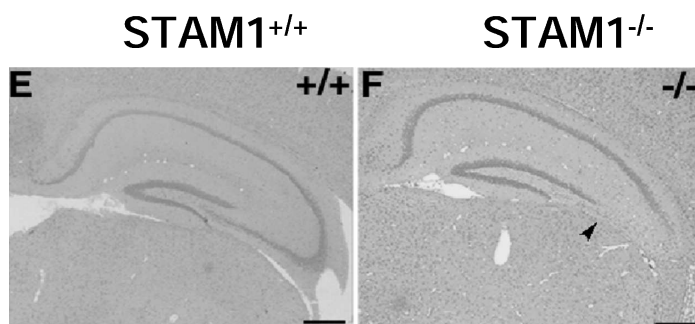


図 2. STAM1 欠損マウスは海馬 CA3 錐体細胞が脱落する

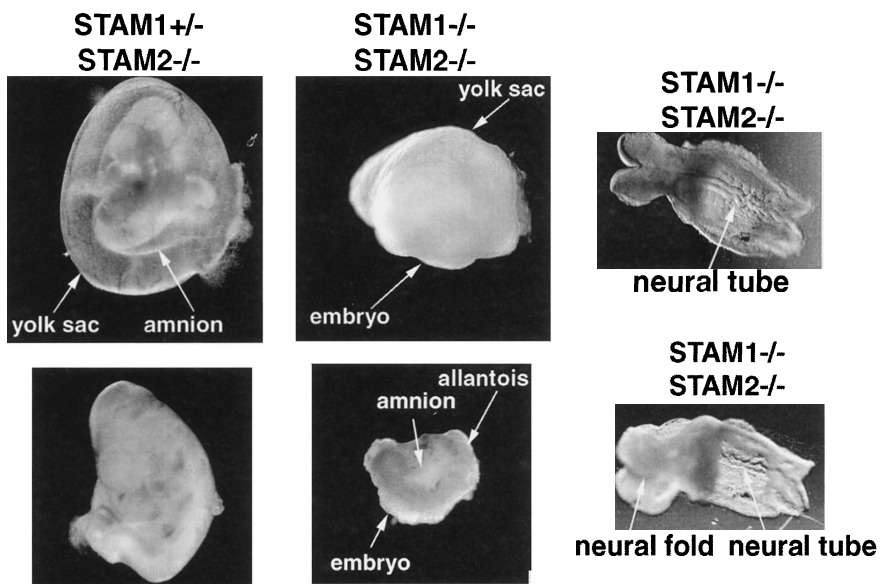


図 3. STAM1/2 ダブル欠損マウスは腹側形態形成期に異常を認め胎生致死となる。

スの発生, 特に腹側形態形成期に重要な役割を担う分子であることがわかった。

3. T 細胞特異的ダブル欠損マウス

ダブルノックアウトマウスは胎生致死になるので, 免疫系特に T 細胞における STAM ファミリー分子の生理的役割を明らかにするため, Cre-LoxP システムを用い T 細胞特異的ダブルノックアウトマウスの作

製し, 解析を行った⁵⁾. STAM2 欠損マウスは正常に出生, 生殖能力をもつので, Cre-LoxP システムを用い STAM1 コンデショナルノックアウトマウスを作製し, Lck-Cre transgenic mouse を用いて交配を行い, T 細胞特異的ダブルノックアウトマウスを作製した. T 細胞特異的ダブルノックアウトマウスの胸腺はコントロールに比し小さく, 有核細胞数が減少しており, TUNEL 染色陽性の細胞が増加していた. 胸腺細胞数はコントロールに比し約 40% に減少していた. ダブル

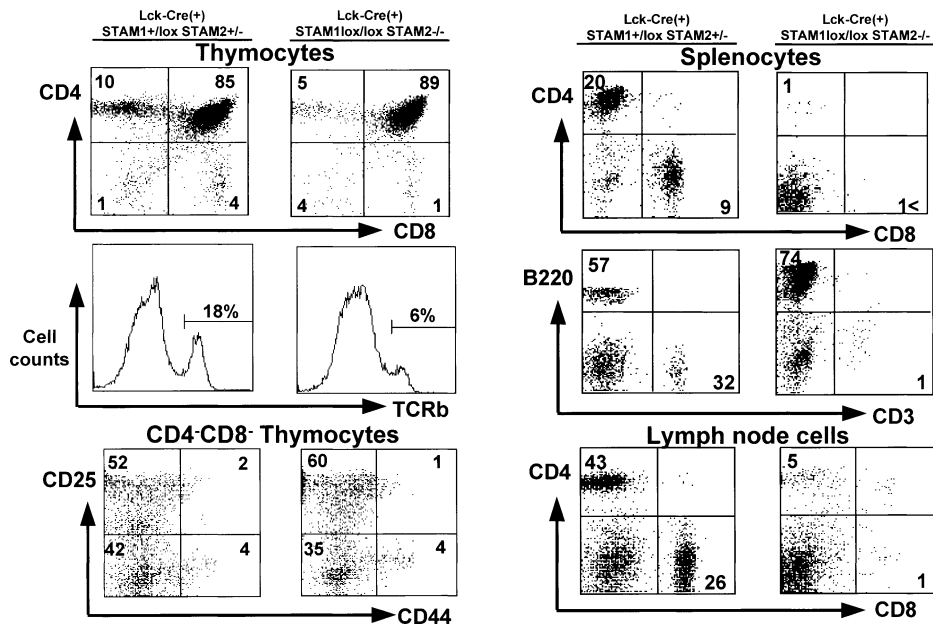


図 4. T 細胞特異的 STAM1/2 ダブル欠損マウスは成熟 T 細胞の数が著減している。

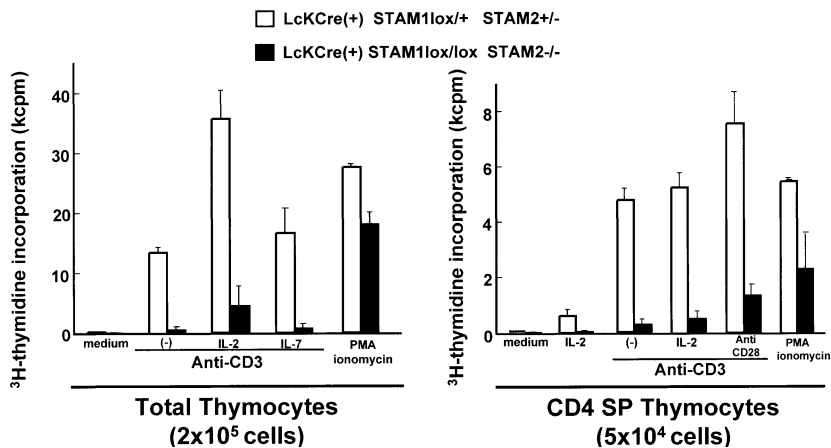


図 5. STAM1/2 ダブル欠損 T 細胞はサイトカイン, 抗原受容体刺激に対する増殖応答が低下している。

ノックアウトマウスでは胸線中の CD4 または CD8 single positive 細胞が減少していた。さらに脾臓、リンパ節において成熟 T 細胞が著明に減少していた (図 4)。さらに、ダブルノックアウトマウスの胸腺 T 細胞のサイトカイン、抗原受容体刺激にたいする増殖応答は有意に低下していた (図 5)。更に、サイトカイン、TCR シグナリングの解析を進めたところ、TCR 刺激における JNK, P38 MAPK のリン酸化はコントロールマウスに比し亢進し、なおかつ遷延していた。以上の結果から STAM1/2 は T 細胞の分化・成熟においても重要な役割を担っていることが明らかになった。

4. STAMs と細胞内小胞輸送

最近, STAM の酵母相同分子が細胞内小胞輸送系に関わることが報告された。哺乳類 STAM もユビキチ

ン結合モチーフをもち、EGF レセプターなどのユビキチン化された細胞表面に存在する受容体の endocytosis とその後の選択・分解機構に関わる可能性が考えられた。先に述べたように TCR 刺激における JNK & P38 MAPK のリン酸化の遷延も、活性化した T 細胞活性化受容体のダウンレギュレーションが傷害されているために起きる現象とも推測された。そこで、共同研究者の免疫学教室の金沢と STAM1/2 ダブル欠損線維芽細胞株を樹立し解析を行った⁶⁾。その結果、EGF 刺激後に起きる EGFR の分解が STAM1/2 ダブル欠損線維芽細胞において障害されていることが判明した。更に、STAM1/2 ダブル欠損線維芽細胞では初期エンドソーム肥大化が認められ初期エンドソームからマルチベジクルボディへの経路が傷害されていることが明らかになった (図 6)。

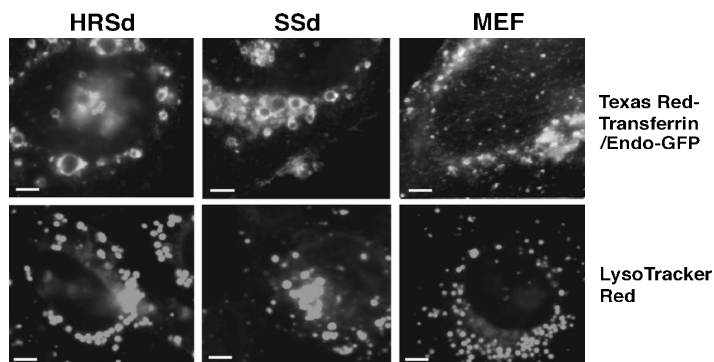


図 6. STAM1/2 ダブル欠損線維芽細胞で認める初期エンドソームの肥大化

SSd: STAM1/2 ダブル欠損線維芽細胞

HRSd: HRS 欠損線維芽細胞, MEF: Wild-Type 線維芽細胞

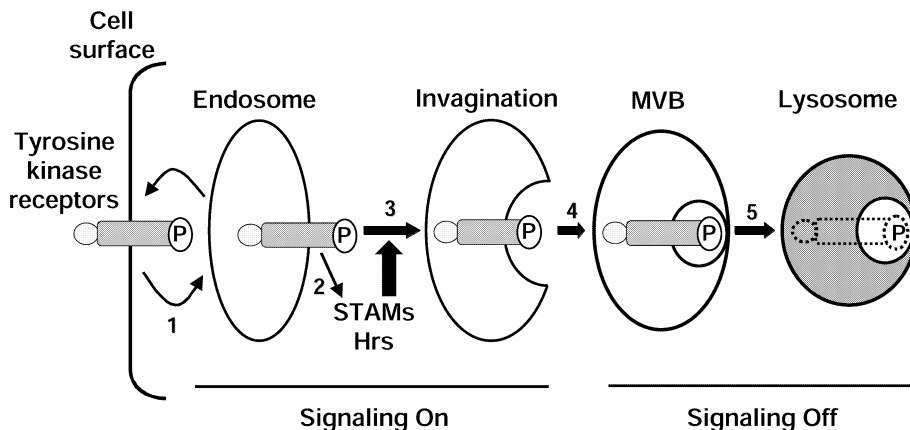


図 7. 細胞内小胞輸送系における STAMs の役割

おわりに

以上の結果から STAM1 及び STAM2 は、免疫系・神経系・個体の発生において、それぞれ単独にあるいは代償的に重要な役割を有していることが判明した。その機能のひとつとして哺乳類細胞内でも細胞内小胞輸送系関わるものが初めて明らかになった(図 7)。現在、東北大学医学部免疫学教室のさらなる研究により、STAM は EGF レセプターなどの各種受容体のダウンレギュレーション、抗原提示細胞における抗原提示機能、ウィルス増殖制御について、細胞内小胞輸送系を介し、重要な役割をになっていることが明らかになってきている。今後、STAMs が神経疾患の病態、ウィルス感染症、増殖因子を介した癌の増殖機構など、疾患の発生にどのように関わっているか、解析を進めている。

謝 辞

本研究を行うにあたり全ての共同研究者に感謝の意を表します。特にノックアウトマウスの作製においてご指導いただいた、免疫学教室石井直人助教授、神経系の解析において多大なご指導をいただいた細胞組織学分野阪上洋行助教授、近藤尚武教授に深謝いたします。最後に本研究のすべてにおいてご指導頂きました免疫学教室菅村和男教授、及び老年呼吸器内科佐々木英忠教授に謹んで深謝いたします。

文 献

- 1) Takeshita, T., Arita, T., Asao, H. et al. (1996) Cloning of a novel signal-transducing adaptor molecule containing an SH3 domain and ITAM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 1035-1039.
- 2) Takeshita, T., Arita, T., Higuchi, M. et al. (1997) STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity*, **6**, 449-457.
- 3) Endo, K., Takeshita, T., Kasai, H. et al. (2000) STAM2, a new member of the STAM family, binding to the Janus kinases. *FEBS Lett.*, **477**, 55-61.
- 4) Yamada, M., Takeshita, T., Miura, S. et al. (2001) Loss of hippocampal CA3 pyramidal neurons in mice lacking STAM1. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3807-3819.
- 5) Yamada, M., Ishii, N., Asao, H. et al. (2002) Signal-transducing adaptor molecules STAM1 and STAM2 are required for T-cell development and survival. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 8648-8658.
- 6) Kanazawa, C., Morita, E., Yamada, M. et al. (2003) Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **309**, 848-856.